

ANSWER 47 OF 66 CAPLUS COPYRIGHT 2006 ACS on STN
 ACCESSION NUMBER: 1982:16679 CAPLUS <<LOGINID::20060726>>
 DOCUMENT NUMBER: 96:16679
 ENTRY DATE: Entered STN: 12 May 1984
 TITLE: Purification of coenzyme Q
 PATENT ASSIGNEE(S): Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc., Japan
 SOURCE: Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 5 pp.
 CODEN: JKXXAF
 DOCUMENT TYPE: Patent
 LANGUAGE: Japanese
 INT. PATENT CLASSIF.: C12P007-66
 CLASSIFICATION: 7-3 (Enzymes)
 Section cross-reference(s): 16
 FAMILY ACC. NUM. COUNT: 1
 PATENT INFORMATION:

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
JP 56131394	A2	19811014	JP 1980-33659	19800317
JP 57021308	B4	19820506		

PRIORITY APPLN. INFO.: JP 1980-33659 A 19800317

PATENT CLASSIFICATION CODES:

PATENT NO.	CLASS	PATENT FAMILY CLASSIFICATION CODES
------------	-------	------------------------------------

JP 56131394	IC	C12P007-66
	IPCI	C12P0007-66
	IPCR	C12P0007-66 [I,A]; C12P0007-66 [I,C*]

ABSTRACT:

A crude coenzyme Q preparation is dissolved in a hydrophobic solvent and extracted with an aqueous NH4OH-alc. mixture to remove the impurities. Thus, 10 g crude ***coenzyme*** Q10 (I) produced by fermentation with Protaminobacter ruber NCIB 2879 was dissolved in 100 mL hexane and impurities extracted with 20 mL of a 28% NH4OH-MeOH (5:95) mixture at 10° for 20 min, the NH4OH-***MeOH*** layer discarded, and remaining impurities extracted a 2nd time from the hexane with 20 mL 95% MeOH at 10° for 20 min. A purified I was recovered from the hexane layer; .apprx.85% of the impurities were removed from the I preparation by the extraction procedure. A 82% pure I was crystallized from acetone by the addition of seed I at room temperature and allowing to stand overnight.

SUPPL. TERM: coenzyme Q purifn; Protaminobacter coenzyme Q fermn
 INDEX TERM: Ubiquinones
 ROLE: PUR (Purification or recovery); PREP (Preparation)
 (purification of, by solvent extraction)
 INDEX TERM: Protaminobacter ruber
 (ubiquinone manufacture with)
 INDEX TERM: Fermentation
 (ubiquinone, with Protaminobacter ruber)
 INDEX TERM: 303-98-0P 2394-68-5P
 ROLE: PUR (Purification or recovery); PREP (Preparation)
 (purification of, by solvent extraction)

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭56—131394

⑪ Int. Cl.³
C 12 P 7/66

識別記号

庁内整理番号
6760—4B

⑬ 公開 昭和56年(1981)10月14日

発明の数 1
審査請求 有

(全 5 頁)

⑭ 補酵素Qの精製方法

⑯ 発明者 早坂伸二

新潟市宝町4の21三菱瓦斯化学
東大山寮内

⑰ 特 願 昭55—33659

⑱ 出 願 昭55(1980)3月17日

⑲ 出 願 人 三菱瓦斯化学株式会社

⑳ 発 明 者 浦上貞治

東京都千代田区丸の内2丁目5
番2号

新潟市小金町1の228

明 細 書

1. 発明の名称

補酵素Qの精製方法

2. 特許請求の範囲

粗補酵素Qの疎水性溶剤溶液とアンモニウム水—アルコール溶液とを接触させて粗補酵素Qに含まれていた不純物をアンモニウム水—メタノール溶液に移行させ、粗補酵素Qから不純物を除去することを特徴とする補酵素Qの精製方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は補酵素Qの精製方法に係り、さらに詳細には、アンモニウム水—メタノール溶液を使用して補酵素Qを精製する方法に関する。

補酵素Qは、生体内では電子伝達系に関係し、心機能不全、重症筋無力症および肺気腫などの各種の疾病に対しては、優れた薬理効果を示す物質である。この補酵素Qは、合成あるいは微生物菌体、天然物からの抽出などの方法により得られるが、これらの方法により得られたもの

は補酵素Qとともに多くの不純物を含み純度が極めて低い。したがって補酵素Qを医薬などの実用に供するためには精製が必要となる。

補酵素Qの精製法には種々あり、たとえばシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製ならびにアセトン、メタノールおよびメチルエチルケトンなどの溶剤を使用する結晶化などがある。しかしながら前記の多くの不純物を含有する補酵素Qをそのままこれらの方法で精製するときには種々の欠点があり工業的には不利となることが多い。

すなわち、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製では精密な分画が必要であるため操作が煩雑となり、かつカラムの負荷が極めて大きくなり大量処理が困難となる。また結晶化では、結晶が析出しにくくなつたりないしは全く析出しないことが多い。

また、精製において不純物を出来る限り多く除去することが好ましいが、それに伴って多量の目的物質が失われるとの通弊がある。

本発明者らは、前記のような補酵素Qの精製法を工業的に有利に行うことができるよう、また多量の不純物の除去ができ、しかも補酵素Qの損失量を極力減少させるために鋭意研究を行なった結果、本発明に到達した。

すなわち、本発明は粗補酵素Qの疎水性溶剤溶液とアンモニア水-アルコール溶液とを接触させて粗補酵素Qに含まれて^る不純物をアンモニア水-メタノール溶液に移行させ、粗補酵素Qから不純物を除去することを特徴とする補酵素Qの精製方法である。

本発明の粗補酵素Qとは、補酵素Q₁₋₁₂とともに不純物を含有するもので、具体的にはたとえば、微生物菌体、動物臓器および血合肉などの生物体からの抽出物あるいは、合成による反応生成物の副産物などおよびさらに精製を経たものが挙げられる。

微生物菌体、動物臓器および血合肉などの生物体から補酵素Qを抽出する方法としては、一般に行なわれている方法としてたとえば、ビリ

- 3 -

性溶剤としては、補酵素Qを溶解し、かつアンモニア水-メタノール溶液と密接合わない溶剤であればいずれの化合物でもよいが、たとえばn-ヘキサン、n-ペンタン、n-ヘプタンおよびイソオクタンなどの脂肪族炭化水素、シクロヘキサンなどの脂環式炭化水素ならびにベンゼン、トルエンおよびキシレンなどの芳香族炭化水素、これらの炭化水素同士の混合物ならびに石油エーテルなどが実用上、好適に使用される。

この疎水性溶剤の使用量は粗補酵素Q中の補酵素Qを溶解しうる量であればよく、実用的には通常、粗補酵素Q 1gに対して0.2~2.0ml程度の割合がよい。なお、粗補酵素Qの疎水性溶剤溶液に不純物が沈殿または浮遊することがあるが、この不純物を必要に応じて除去してもよい。

なお粗補酵素Qの疎水性溶剤溶液として、前記のようにあらかじめ調製した粗補酵素Qを疎水性溶剤に溶解した溶液のほか、抽出または

- 5 -

ジシ、メタノール、エタノール、エチルエーテル、アセトン、あるいはアセトニトリルなどの溶剤で室温あるいは加熱状態で抽出する方法、ビロガロールの存在下にアルコール性アルカリでけん化を行つたのち抽出する方法、ならびに補酵素Qを含む物質の水懸濁液を酸、アルカリ処理後水性溶剤で逐々抽出する方法などが通常行なわれる。さらに、このようにして抽出で得られた、または合成によつて得られた補酵素Qをあらかじめ、たとえば、n-ヘキサン、アセトンまたはアセトニトリルによる抽出、メタノール洗浄などによる不純物の除去およびアセトン、エタノールまたはメチルエチルケトンなどを使用した結晶化などによつて不純物の一部をあらかじめ除去してこれを本発明での粗補酵素とすることも妨げない。

本発明で精製される粗補酵素Q中の水および溶媒などの揮発性物質の含有率は低いほど好ましい。

本発明に使用する粗補酵素Qを溶解する疎水

- 4 -

精製における疎水性溶剤を抽剤として使用した抽出液自体も使用しうる。

本発明でのアンモニア水-アルコール溶液とはアンモニア水とアルコールとの混合液である。アンモニア水のアンモニア濃度には特に制限はないが、実用上、10~30wt%が好適である。アルコールは通常、メタノールおよびエタノールなどの低級脂肪族アルコールが使用されるが、就中、メタノールが最も好ましい。アンモニア水-アルコール溶液中のアンモニア水の含有率は特に制限はないが、実用上2~40vol%が好ましい。

粗補酵素Qの疎水性溶剤溶液と接触させるアンモニア水-アルコール溶液の量は特に制限はないが、実用上、粗補酵素の疎水性溶剤溶液に対して1/20~1容量倍程度が好ましい。

粗補酵素Qの疎水性溶剤溶液とアンモニア水-アルコール溶液との接触は、たとえば両者を混合し、室温ないし室温で約5分以上、実用上好ましくは約5分ないし2~3時間攪拌するこ

- 6 -

とにより行なわれる。その後、この液を静置して軽液層と重液層とに分離し軽液層を除去する。軽液層は不純物が除去された補酵素Qの碳水性溶剤溶液であり、重液層は不純物を含有しているアンモニア水-アルコール溶液である。

この接触は1回でもよいが2～5回くりかえしてもよい。

この軽液層には不溶物が浮遊していることがあるが、この不溶物を除去しなければならない。

また、この軽液層には微量のアンモニアが溶存しているが、このアンモニアを除去することが好ましい。アンモニアを除去する手段として短時間で減圧下で蒸発させるか、またはアルコール水溶液に接触させるなどがある。

後者においてアルコールとはメタノールおよびエタノールなどの低級脂肪族アルコールであり、就中メタノールが好ましい。アルコール水溶液のアルコール濃度は実用上、60 vol%程度以上、好ましくは60～98 vol%、特に好ましくは80～98 vol%である。接触の条件

- 7 -

の結晶化に引続いて再結晶をくりかえすと極めて純度の高い補酵素Qが得られる。

本発明の方法によれば、極めて簡単な処理で容易に高純度の補酵素Qを高収率にて得ることができるものであり、しかも大量の処理が容易であり、また引続いて行なわれる精製の負荷を減じ、また困難性を排除し工業的に有利に行なうことができる。

つぎに本発明を具体的に示すために実施例を掲げるが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

実施例 1

500gの工業用水に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5kg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75kg、 KH_2PO_4 2.25kg、 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 15g、 $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 45g、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.5g、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7.5g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.75g、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 $\text{CoC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 H_3BO_3 0.5g、 NaCl 25gおよびKI 0.5

- 9 -

は、たとえば軽液層に対して10～100倍のアルコール水溶液を使用し常温ないし室温で5分ないし2～3時間かくはんすることが好ましい。この接触は1回でもよいが、2～5回くりかえしてもよい。

このようにして得られた軽液層から減圧蒸餾などにより碳水性溶剤を除去して補酵素Qが得られる。

本発明の方法により、粗補酵素Qに含まれていた不純物の約20～90wt%が除去される。

このようにして得られた補酵素Qの純度をさらに高めるためにはさらに精製を重ねることが必要である。この精製にはカラムクロマトグラフィによる精製およびアセトン、エタノールまたはメチルエチルケトンなどの溶剤を使用し、20～5℃で冷却する結晶化による精製などがある。なお、結晶化において、補酵素Qにこれと同量以上の不純物が同伴している場合には、カラムクロマトグラフィなどによりこの不純物をあらかじめ除去することが好ましい。またこ

- 8 -

ろを溶解しpH 7.0に調整し、滅菌した後、メタノール 7kgを添加した。これにメタノールを1wt%含む同様な組成の培地 30gで3日間前培養したプロタミノバクター ルバーNCIB 2879を接種し、28℃で500g/mlの空気を通気し、攪拌数1000r.p.m.で3日間培養した。なお、培養液にアンモニア水を加えることにより培養液のpHを7.0に保った。培養後、遠心分離機で集菌しスプレードライヤーで乾燥し、乾燥菌体 1.8kgを得た。乾燥菌体 1.8kgに6gのアセトンを加え30℃で1時間攪拌して抽出を行なったのち菌体をろ別する。この操作を3回反復した。3回分の抽出液を合せて、減圧蒸餾して溶剤を除去して粗補酵素Q₁₀(II) 10gを得た。

この粗補酵素Q₁₀(II) 10gを、100mlのn-ヘキサンに溶解し、不溶物をろ別した。この液に、アンモニア濃度28wt%のアンモニア水を5vol%含むアンモニア水-メタノール溶液 20mlを加え10℃で20分間攪拌したの

- 10 -

ち静置し、 n -ヘキサン層とアンモニア水-メタノール溶液層とを分離させ、アンモニア水-メタノール溶液層を除去した。この操作を2回反復した。このようにして得られた n -ヘキサン層にメタノール濃度95 vol%のメタノール水溶液 20 mlを加え、10℃で20分間攪拌したのち静置し、 n -ヘキサン層とメタノール水溶液層を分離させ、メタノール水溶液層を除去した。この n -ヘキサン層を減圧濃縮して溶剤を除去し粗補酵素 $Q_{10}(I)$ 3.0 gを得た。粗補酵素 $Q_{10}(I)$ 中の不純物の約85%が除去されていた。

この粗補酵素 $Q_{10}(I)$ 3.0 gを30 mlのアセトンに溶解し-10℃のデープフリーザーに2時間静置後、溶液が5℃以下になっていることを確認した後、純度99.8%の補酵素 Q_{10} の粉末 0.1 gを添加した。これを2昼夜フリーザー中に静置し、析出した結晶をろ取した。結晶を真空状態で室温にて1昼夜真空乾燥し、2.2 gの補酵素 Q_{10} の結晶を得た。このもの

-11-

液にアンモニア水を加えることにより培養液のpHを4.0に保つた。培養後、遠心分離機で集菌し、湿菌体 10 kg(乾燥菌体量 1.8 kg)を得た。菌体を19 gのメタノールに懸濁し、60 wt%苛性ソーダ 4700 mlおよびピロガロール 950 gを添加してけん化し、けん化液に水 70 gを加え、その液と等容の n -ペンタンで3回抽出し、 n -ペンタン層を水洗、炭水後濃縮して粗酵素 $Q_8(II)$ を得た。

この粗酵素 $Q_8(II)$ 6 gを100 mlの n -ペンタンに溶解し、これにアンモニア濃度14 wt%のアンモニア水を20^(vol) ml多含むアンモニア水-メタノール溶液 20 mlを加え、20℃で30分間攪拌したのち静置し、 n -ペンタン層とアンモニア水-メタノール溶液層とを分離させアンモニア水-メタノール溶液層を除去した。この操作を2回反復したのち n -ペンタン層にメタノール濃度95 vol%のメタノール水溶液 20 mlを加え、20℃で30分間攪拌したのち静置し、 n -ペンタン層とメタノール水溶液層

-13-

の純度は82%であった。

一方、前記と同様な方法で得られた粗補酵素 $Q_{10}(I)$ 10 gをそのまま前記と同様に結晶化操作に付したが、結晶は析出しなかった。

実施例 2

500 gの工業用水 $K(NH_4)_2SO_4$ 0.5 kg、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.75 kg、 KH_2PO_4 2.25 kg、 $FeC_6H_5O_7 \cdot xH_2O$ 15 g、 $CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$ 45 g、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 7.5 g、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 7.5 g、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.75 g、 $(NH_4)_4Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 0.5 g、 $CoC_2O_4 \cdot 2H_2O$ 0.5 g、 H_3BO_3 0.5 g、 $NaCl$ 25 gおよびKI 0.5 gを溶解し、pH 4.0に調整し滅菌した後、メタノール 7 kgを添加した。これにメタノールを1 wt%含む同様な組成の培地 30 gで3日間培養したビチア パストリス IPO-1043を接種し、50℃で500 g/minの空気を通気し、攪拌数1000 r.p.m.で3日間培養を行なった。なお、培養

-12-

とを分離させ、メタノール水溶液層を除去した。 n -ペンタン層を減圧濃縮して溶剤を除去して、粗補酵素 $Q_8(II)$ 2.0 gを得た。粗補酵素 $Q_8(II)$ 中の不純物の約80%が除去されていた。

この粗補酵素 $Q_8(II)$ 2.0 gを20 mlのメチルエチルケトンに溶解し-10℃のデープフリーザーに2時間静置後、溶液が5℃以下になっていることを確認した後、純度99.8%の補酵素 Q_8 の粉末 0.1 gを添加した。これを2昼夜フリーザー中に静置し、析出した結晶をろ取した。結晶を真空状態で室温にて1昼夜真空乾燥し、1.3 gの補酵素 Q_8 の結晶を得た。このものの純度は約77%であった。

一方、前記と同様な方法で得られた粗補酵素 $Q_8(II)$ 6 gをそのまま前記と同様に結晶化操作に付したが結晶は析出しなかった。

実施例 3

イソカブレノールと2,3-ジメトキシ-5-メチルヒドロキノンを反応させて得ら

-14-

れた粗補酵素 Q_{10} (II) 5 g を 50 ml のシクロヘキサ
 ンに溶解した溶液に、30 wt% のアンモニア
 水を 3 vol% 含むアンモニア水-メタノール
 溶液 10 ml を加え 30℃ で 15 分間攪拌した
 のち静置し、シクロヘキサン層とアンモニア水-
 メタノール溶液層とを分離させ、アンモニア
 水-メタノール溶液層を除去した。この操作を
 2 回反復し、さらにこのシクロヘキサン層にメ
 タノール濃度 97 vol% のメタノール水溶液
 10 ml を加え 30℃ で 15 分間攪拌したのち静
 置し、シクロヘキサン層とメタノール水溶液層
 とを分離させ、メタノール水溶液層を除去した。
 このシクロヘキサン層を減圧濃縮して溶剤を除
 去して粗補酵素 Q_{10} (IV) 5.0 g を得た。粗補
 酵素 Q_{10} (重) 中の不純物の約 64% が除去されて
 いた。この粗補酵素 Q_{10} (IV) 3 g を 15 ml のア
 セトンに溶解し、さらに 15 ml のメタノールを
 加え -10℃ のデュープフリーザーに 2 時間静
 置後、溶液が 5℃ 以下になつてゐることを確認
 した後、純度 99.8% の補酵素 Q_{10} の粉末

-15-

0.1 g を添加した。さらにこれを 2 昼夜フリ
 ーザー中に静置し、析出した結晶をろ取した。
 結晶を真空状態で盛器にて一昼夜真空乾燥し、
 2.5 g の補酵素 Q_{10} の結晶を得た。このもの
 の純度は約 75% であつた。

一方、前記と同様な方法で得られた粗補酵素
 Q_{10} (II) 5 g をそのまま前記と同様に結晶化操
 作に付したが結晶は析出しなかつた。

特許出願人 三菱瓦斯化学株式会社

代表者 相 川 肇 吉

-16-